Bt Cry1Ac 毒素筛选的粉纹夜蛾离体抗性细胞与敏感细胞蛋白质组的差异分析

蒋才富，刘凯于，彭　蓉，郑　进，彭建新，洪华珠*
（华中师范大学，教育部农药与化学生物学重点实验室，武汉　430079）

摘要：采用双向电泳技术和肽质量指纹图谱技术分析了 Bt Cry1Ac 毒素筛选的粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 抗性 BTI-Tn-5B1-4 细胞与同源敏感细胞的蛋白质组的差异。用 Melanie Viewer Ⅱ 软件在抗性细胞的双向电泳图谱上检测到的平均蛋白质点数为 707 ± 25 个（$n = 3$），在敏感细胞的双向电泳图谱上检测到的平均蛋白质点数为 637 ± 19 个（$n = 3$），其中分辨率高、重复性良好的显著差异点有 10 余个。对其中的一个敏感细胞特有的显著差异斑点进行了肽质量指纹图谱分析，经数据库查询表明该蛋白质与胞质外周蛋白具有同源性。

关键词：BTI-Tn-5B1-4 细胞；Cry1Ac；抗性；双向电泳；肽质量指纹图谱分析
中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)05-0686-05

Differential proteomic analysis of Bt Cry1Ac toxin-resistant and susceptible BTI-Tn-5B1-4 cells

JIANG Cai-Fu, LIU Kai-Yu, PENG Rong, ZHENG Jin, PENG Jian-Xin, HONG Hua-Zhu* (Key Laboratory of Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The proteomic difference between the resistant BTI-Tn-5B1-4 selected by Bt Cry1Ac and the susceptible cell from the same cell clone was compared using dielectrophoresis (2-DE) and peptide mass fingerprint technology. 707 ± 25 dots ($n = 3$) were detected on the resistant cell's proteomic 2-DE map, and 637 ± 19 ($n = 3$) on the susceptible cell's proteomic 2-DE map with Melanie Viewer Ⅱ software. More than ten unmatched dots with good repetition and high resolution have been detected. One differential dot with good repetition on the susceptible cell's 2-DE map was measured using the peptide mass fingerprint technology and searched in the SWISS-PROT database, and the results showed that the protein was homologous with the periplasmic protein.

Key words: BTI-Tn-5B1-4 cell; Cry1Ac; resistance; dielectrophoresis; peptide mass fingerprint

随着转苏云金芽孢杆菌（Bt）基因植物以及 Bt 生物农药的推广，许多有害昆虫对 Bt 类制剂产生了不同程度的抗性（McGuaghey, 1985; Whalon *et al*., 1993; Lee *et al*., 1995）。近年来关于昆虫对 Bt 产生抗性的分子机制已有比较多的报道。在某些昆虫抗性品系中已经确定了一些抗性相关基因，Linda 等（2001）研究表明烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 对 Bt 产生抗性主要是由于钙粘蛋白基因内插入反转座子所至。Zhu 等（2000）研究表明印度谷螟 *Plodia interpunctella* 抗性品系中氨肽酶基因的错义点突变可能与其抗性的产生相关。然而，也有与以上报道相左的报道，Linda 等（2002）在另一烟芽夜蛾抗性品系中发现其抗性与钙粘蛋白和氨肽酶基因并无多大关系；Liu 等（2000）报道小菜蛾 *Plutella xylostella* 一个 Cry1C 抗性品系的 BBMV 与毒素的结合量的改变以及中肠蛋白酶活化毒素能力的改变都不是主要的抗性机制；Griffitts 等（2001）对模式生物线虫 *Caenorhabditis elegans* 的研究表明其对 Bt 毒素产生抗性主要是由于中肠中缺少 β-1,3-半乳糖糖基转移酶。不同昆虫甚至同种昆虫同一种群的不同个体的抗 Bt 机制都可能不同，目前可能还有相当多的 Bt 抗性相关基因未被发现，对昆虫的抗 Bt 机制问题还需深入研究。

自 O'Farrell（1975）提出双向电泳（dielectrophor-

基金项目：国家自然科学基金项目（39070014）
作者简介：蒋才富，男，1979 年生，四川眉山人，硕士研究生，E-mail: jcaifuren@etang.com
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hzhong@ccnu.edu.cn
收稿日期 Received: 2003-09-05；接受日期 Accepted: 2003-11-03

esis)技术以来，这项技术经过不断发展，它与肽质量指纹图谱分析技术和氨基酸测序技术相结合，已成为研究蛋白质组的关键核心技术之一，近年来这项技术已广泛应用于细胞周期、细胞分化、肿瘤病理等许多领域的研究(Klose and Kobalz, 1995)。本研究采用此技术分析了粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 对 Cry1Ac 敏感及抗性的 BTI-Tn-5B1-4 细胞的蛋白质组组分差异，并采用肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint)技术分析了一个敏感细胞特有的差异蛋白点。所得实验结果为进一步研究 Bt 抗性的发生机制提供了基础。

1　材料和方法

1.1　细胞及培养基

粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞系由美国康奈尔大学 Granados 教授馈赠，它对 Bt Cry1Ac 毒素非常敏感，LC_{50}约为 10 μg/mL；粉纹夜蛾抗 Cry1Ac 的 BTI-Tn-5B1-4 细胞是经初步纯化的 Cry1Ac 活性毒素以 80% ~ 90% 的选择压力历经三年半连续筛选 83 代后获得的，用 MTT 法测得其抗性比大于 1 280 倍，它对多种商品化 Bt 制剂的晶体毒素都有较高的交互抗性。培养基为 FMN-TH，添加 5% 的胎牛血清，28℃恒温培养。

1.2　药品及主要试剂

两性电解质为北京军事医学科学院产品；十二烷基磺酸钠(SDS)，NP-40，巯基乙醇，AP 和 TEMED 为 Sigma 公司产品；Arc-Bis 为 Promega 公司产品；DTT 为 Amresco 公司产品；低分子量蛋白质标准为晶美公司产品；其他均为国产分析纯试剂。

1.3　样品制备

参照李永明和赵玉琪(1998)的方法。收集对数生长期的抗性和敏感细胞各一瓶，各加入 40 μL IEF 细胞裂解缓冲液(9 mol/L 尿素，2% pH 3 ~ 9.5 的两性电解质，4% NP-40，1% DTT)，再分别加入 15 U DNase，冰上放置 30 min，用 Bradford (1976)方法测定蛋白质含量后用于双向电泳分析。

1.4　方法

1.4.1　第一相等电聚焦：第一相等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)参照李永明和赵玉琪(1998)的方法，凝胶浓度为 3%，内含 9 mol/L 尿素，2% NP-40，两性电解质 2%($V_{pH5\sim7}$: $V_{pH3\sim9.5}$ = 2 : 1)，TEMED 0.05%，AP 0.05%。每孔样品上样量为 0.15 mg，600 V 电泳过夜后 1 000 V 继续电泳 3 h，等电聚焦结束后取出柱状胶置于平衡液(5% 巯基乙醇，0.125 mol/L pH 6.8 的 Tris-HCl，2.5% SDS，10% 甘油)中平衡 15 min 后用于第二相 SDS-PAGE 分析。

1.4.2　第二相 SDS-PAGE 分析：第二相 SDS-PAGE 分析根据 Laemmli (1970)的方法。分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度为 5%，180 V 电泳至分离胶后 200 V 电泳至溴酚蓝接近凝胶底部，电泳结束后用银染法进行染色(Wary *et al.*, 1981)。

1.4.3　凝胶图像分析：银染显色的凝胶通过 Gel Doc 2000 凝胶成像系统获取图像，用 Melanie Viewer Ⅱ 软件进行蛋白质点分析。

1.4.4　肽质量指纹图谱分析：将差异点从凝胶上挖出后送上海基康公司作肽质量指纹图谱分析，将获得的数据在 SWISS-PROT 数据库中进行查询。

2　结果

2.1　双向电泳结果

在实验过程中，为提高两种细胞蛋白组分的可比性，我们选用的细胞都是处于对数生长期的生长状态良好的细胞，两种细胞的蛋白样品的制样、上样量、第一相等电聚焦时间、聚焦强度、第二相电泳过程以及染色过程都保持条件一致；同时为确保结果的准确性，每种蛋白样品都进行了至少 3 次重复实验。

染色后的凝胶经 Melanie Viewer Ⅱ 软件进行斑点分析，抗性细胞双向电泳图谱的平均蛋白质点数为 707 ± 25(n = 3)个，敏感细胞双向电泳图谱的平均蛋白质点数为 637 ± 19(n = 3)个，检测到的多肽斑点有较广的分子量范围(12 kD ~ 120 kD)和较宽的 pI 范围(4 ~ 9)，两种细胞蛋白质组的双向电泳图谱存在显著差异，如图 1、图 2、图 3、表 1 所示。在两种细胞之间存在差异的多肽斑点，有的为敏感细胞所特有(图 3：B)，有的为抗性细胞所特有(图 3：C, D)，有的为两者共有，但在量上存在显著差异(图 3：A)。其中分辨率高、重复性好的差异显著的蛋白质点有 10 多个，其分子量和等电点见表 1。

2.2　肽质量指纹图谱分析及检索结果

染色结束后，挖取了一个重复性好的敏感细胞特有的差异斑点(图 3：B)，送上海基康公司进行肽质量指纹图谱分析，结果见图 4。将所得结果在 SWISS-PROT 数据库中进行查询，结果见表 2，推测该蛋白质很可能是一种细胞质膜蛋白。

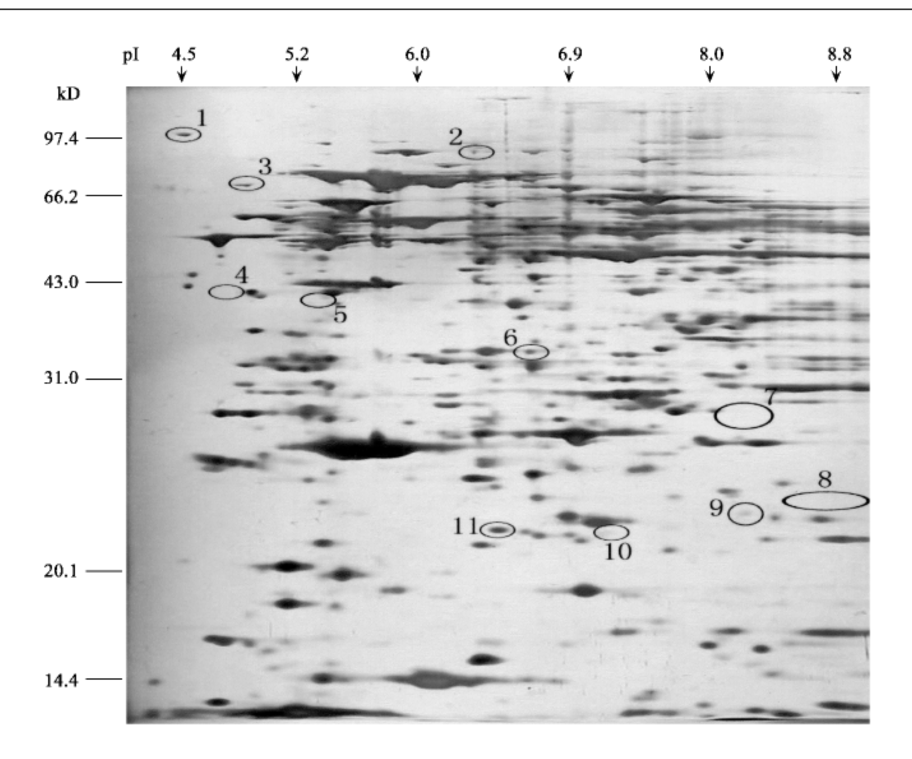


图 1 敏感细胞蛋白质组的双向电泳图谱

Fig. 1 The proteomic dielectrophoresis map of the susceptible cell

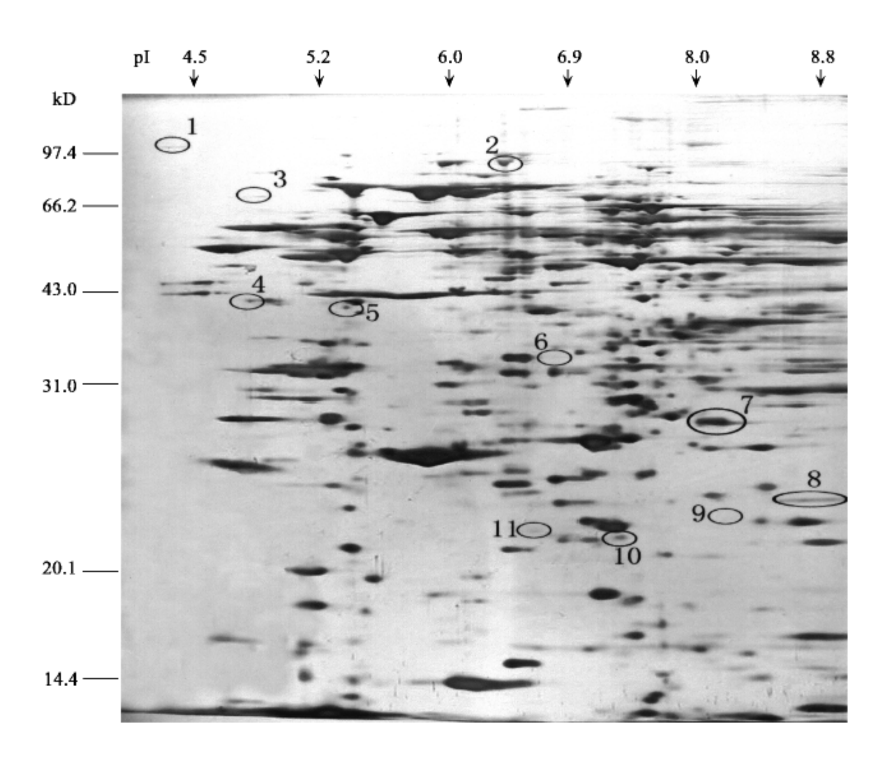


图 2 抗性细胞蛋白质组的双向电泳图谱

Fig. 2 The proteomic dielectrophoresis map of the resistant cell

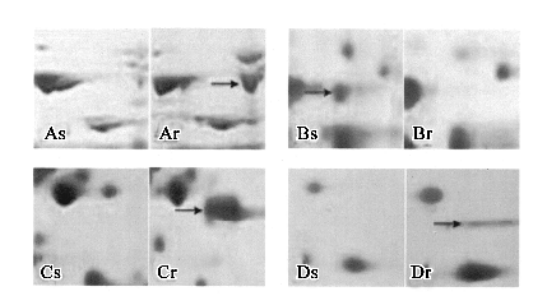


图3　局部显示部分差异多肽斑点

Fig. 3　Partial display of some differential polypeptides

A，B，C，D分别对应图1，图2中的2，6，7，8。

A，B，C，D corresponding to 2，6，7，8 on Fig. 1 and Fig. 2.

表1　部分差异显著的蛋白质点的分子量及等电点

Table 1　The molecular weight and pI of some differential protein dots

差异点 Unmatched dots	等电点 pI	分子量(kD) Molecular weight	敏感细胞 Susceptible cell	抗性细胞 Resistant cell
1*	4.5	98.5	+	−
2*	6.5	88.7	−	+
3*	4.8	65.5	+	−
4	4.7	39.2	−	+
5*	5.4	38.8	−	+
6	6.7	35.5	+	−
7	8.2	28.5	−	+
8	8.7	22.5	−	+
9*	8.3	21.8	+	−
10*	7.0	21.1	+	−
11*	6.4	21.1	+	−

*表示该蛋白质点在双向电泳图谱上只存在量的差异 Indicating the protein dots only have quantitative difference on the dielectrophoresis map.

表2　敏感细胞的一个差异蛋白在SWISS-PROT数据库中的检索结果

Table 2　Searching result of one differential protein of the susceptible cell in SWISS-PROT database

相似蛋白名称 Rank protein name	GenBank 注册号 GenBank Accession No.	分子量/等电点 Molecular weight/pI	相似性(%) Intensity
胞质结合蛋白 Periplasmic binding protein	21397566	36383/7	50
推测的胞质磷酸盐结合蛋白 Possible periplasmic phosphate binding protein	15791973	36138/6.7	17

3　讨论

利用双向电泳技术研究不同特性的同源组织及细胞的蛋白质表达差异，是蛋白质组学的一个重要研究方面。作者在比较了抗性细胞和敏感细胞与Cry1Ac毒素的结合差异较小的基础上（刘凯于等，2003），为进一步探讨粉纹夜蛾BTI-Tn-5B1-4细胞对Bt Cry1Ac毒素的抗性机制，采用双向电泳技术比较了Cry1Ac毒素抗性细胞与同源敏感细胞之间的蛋白质组组成差异。本研究所用的两种细胞来自同一克隆细胞系BTI-Tn-5B1-4，其基因组差异小，但蛋白质组存在显著差异，这些差异蛋白质点的产生涉及到差异蛋白质点对应基因的开闭及基因突变等，而这些变化都可能导致昆虫对Bt产生抗性，因此这些差异蛋白质点可作为抗性相关的候选蛋白质。本研究结果与最近Mehmet等（2003）的结果有相似之处，该报道用双向电泳技术比较了印度谷螟抗Bt昆虫与敏感昆虫中肠蛋白组分差异，发现F_1F_0-ATP酶和

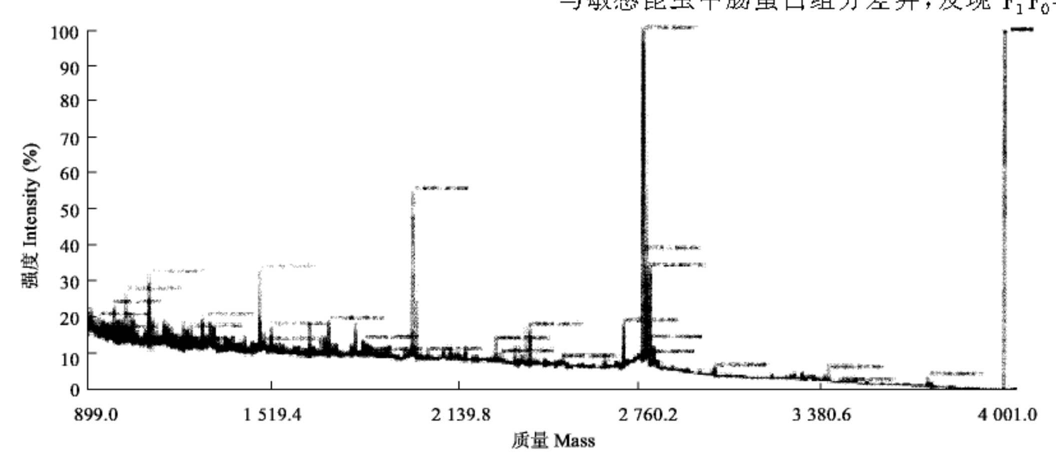


图4　敏感细胞的一个差异蛋白的肽质量指纹图谱分析结果

Fig. 4　Peptide mass fingerprint result of one protein spot from the dielectrophoresis gel of the susceptible cell

胰凝乳蛋白酶等多种蛋白在两者之间存在差异，并且推测这些蛋白质可能直接或间接的与抗性相关。本研究通过对一个敏感细胞所特有的差异蛋白质点进行肽质量指纹图谱分析和同源性搜索，表明它与细胞质膜上的一种外周蛋白有一定的相似性，推测它可能在敏感细胞中与Cry1Ac毒素受体协同作用，或者起到非特异性受体的功能，促进Cry1Ac毒素在质膜上形成孔洞，介导毒素对细胞的毒力，而缺失此蛋白可能导致抗性的产生。

本实验对两种细胞蛋白质组的大多数差异蛋白仅进行了初步的鉴定(等电点和分子量)，要真正阐明这些差异点与粉纹夜蛾BTI-Tn-5B1-4细胞对Bt Cry1Ac毒素的抗性之间的关系还有很多工作要做，在此实验结果的基础上今后可以对更多的差异点进行肽质量指纹图谱分析，并对部分差异蛋白点进行测序，从而设计简并引物克隆差异蛋白点所对应的基因，为进一步系统的鉴定抗性相关基因提供了基础。

参考文献(References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Griffitts JS, Whitacre JL, Stevens DE, Aroian RV, 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, 293: 860 – 864.

Klose J, Kobalz U, 1995. Two dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16: 1 034 – 1 059.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 – 685.

Lee MK, Rajamohan F, Gould F, Dean DH, 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA δ-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3 836 – 3 842.

Linda JG, Fred G, David GH, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857 – 860.

Linda JG, Gould F, Heckel DG, 2002. Identification and mapping of a second major gene conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Science* (ISMIS Abstracts of the Fourth International Symposium on Molecular Insect Science), 2(17): 18 – 19.

Liu KY, Jiang CF, Hong HZ, Peng JX, Yu ZH, 2003. Comparison of studies on Cry1Ac-binding in resistant and susceptible cells in *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1. *Entomological Knowledge*, 40 (3): 247 – 250. [刘凯于，蒋才富，洪华珠，彭建新，余泽华，2003. 粉纹夜蛾细胞中Bt Cry1Ac选择抗性的研究及离体品系与毒素结合的比较. 昆虫知识，40 (3): 247 – 250]

Liu YB, Bruce ET, Luke M, Baltasar E, Juan F, 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth. *Journal of Economic Entomology*, 93 (1): 1 – 6.

Li YM, Zhao YQ, 1998. Practical Protocols in Molecular Biology. Beijing: Science Press. 343 – 344. [李永明，赵玉琪，1998. 实用分子生物学方法手册. 北京：科学出版社. 343 – 344]

McGuaghey WH, 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229: 193 – 195.

Mehmet C, Olga L, Brenda O, Pradeepa K, Lee A, Bulla J, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2: 19 – 28.

O' Farrell PH, 1975. High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4 007 – 4 021.

Whalon ME, Miller DL, Hollingworth RM, Grafius EJ, Miller JR, 1993. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 86: 226 – 233.

Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R, 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 118(1): 197 – 203.

Zhu Y, Kramer KJ, Oppert B, Dowdy AK, 2000. cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 215 – 224.

(责任编辑：黄玲巧)